

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6134331号
(P6134331)

(45) 発行日 平成29年5月24日 (2017.5.24)

(24) 登録日 平成29年4月28日 (2017.4.28)

(51) Int.Cl.	F I	
A 6 1 K 31/7032 (2006.01)	A 6 1 K 31/7032	
A 6 1 K 36/64 (2006.01)	A 6 1 K 36/64	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
請求項の数 13 (全 10 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-546303 (P2014-546303)	(73) 特許権者	510118145
(86) (22) 出願日	平成24年12月17日 (2012.12.17)		杏輝天力 (杭州) 薬業有限公司
(65) 公表番号	特表2015-500300 (P2015-500300A)		中華人民共和国浙江省杭州市余杭經濟開發區紅豐路599號
(43) 公表日	平成27年1月5日 (2015.1.5)	(74) 代理人	110000671
(86) 国際出願番号	PCT/CN2012/086796		八田国際特許業務法人
(87) 国際公開番号	W02013/087042	(72) 発明者	林 漢 欽
(87) 国際公開日	平成25年6月20日 (2013.6.20)		台湾台北市水源路49号3楼之2
審査請求日	平成27年12月15日 (2015.12.15)	(72) 発明者	蘇 慕 寰
(31) 優先権主張番号	61/576,367		台湾宜蘭県冬山郷中山村84号
(32) 優先日	平成23年12月16日 (2011.12.16)	(72) 発明者	黄 永 名
(33) 優先権主張国	米国 (US)		台湾宜蘭県冬山郷中山村84号
		(72) 発明者	唐 静 静
			台湾宜蘭県冬山郷中山村84号
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 アミロイドペータペプチド関連の疾患または症状の予防または治療のための医薬組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

アクテオシドおよびイソアクテオシドをアミロイド ペプチドの形成、蓄積、または集合を抑制する有効成分として含み、前記イソアクテオシドの前記アクテオシドに対する重量比が約4:1~約2:3である、アミロイド ペプチド関連の疾患または症状の予防または治療のための医薬組成物。

【請求項2】

エキナコシドを含まない、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

前記アミロイド ペプチドの細胞外の形成、蓄積、または集合を抑制する、請求項1または2に記載の医薬組成物。

【請求項4】

前記アミロイド ペプチドに起因する神経損傷またはアポトーシスを抑制し、これにより学習および記憶能力を維持、改善または回復する、請求項1~3のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項5】

前記アミロイド ペプチド関連の疾患または症状は、アルツハイマー病、軽度認知障害、レビー小体認知症、ダウン症候群、遺伝性アミロイド性脳出血 (HCHWA) オランダ型、グアムのパーキンソニズム認知症複合、脳アミロイド血管症、封入体筋炎、前頭側頭認知症、加齢性黄斑変性症、またはピック病である、請求項1~4のいずれか1項に記載

の医薬組成物。

【請求項 6】

アルツハイマー病の治療のための請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

生命体のアルツハイマー病罹患の予防または遅延のための請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

ヒトへの前記医薬組成物の有効投与量が、1日に体重 1 kg あたり、前記有効成分の 0.2 mg ~ 4.0 mg に相当する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記有効成分の源として植物から抽出したフェニルエタノイド配糖体の製剤を含み、前記製剤が前記イソアクテオシドおよび前記アクテオシドを主要なフェニルエタノイド配糖体として含み、前記イソアクテオシドの含有量が前記アクテオシドの含有量より大きい、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記製剤は、製剤重量を基準として、12 ~ 32 % のアクテオシドと 26 ~ 46 % のイソアクテオシドとを含む、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記植物はカンカニクジュヨウである、請求項 9 または 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

a) 前記カンカニクジュヨウの多肉質茎を第一の極性溶剤を用いて抽出する工程；
b) 工程 a) から得られた抽出物を、濃縮後、疎水性マクロポラスポリマービーズを充填したカラムに導入し、これによりフェニルエタノイド配糖体が前記ポリマービーズに吸着できるようにする工程；

c) 移動層洗浄液として第二の極性溶剤を用いて、前記カラムを洗浄し、前記フェニルエタノイド配糖体の大部分をポリマービーズ上に吸着させたまま遊離の化合物を除去する工程；

d) 第三の極性溶剤を用いて、ポリマービーズから前記フェニルエタノイド配糖体を溶出させ、前記フェニルエタノイド配糖体を含む溶出液を得る工程、この際、前記第一の極性溶剤は、水、メタノール、エタノール、水とメタノールとの混合溶剤、または、水とエタノールとの混合溶剤であり；前記第二の極性溶剤は水であり；および前記第三の極性溶剤は、メタノール、エタノール、水とメタノールとの混合溶剤、または、水とエタノールとの混合溶剤であり、かつ前記第三の極性溶剤は前記第二の極性溶剤よりも極性が低い；

e) 工程 d) から得られた前記フェニルエタノイド配糖体を含む溶出液を濃縮し、再び水に溶解し、得られた水溶液をマクロポラス樹脂と接触させて、前記フェニルエタノイド配糖体を前記マクロポラス樹脂に吸着させる工程；および

f) 前記マクロポラス樹脂を第四の極性溶剤と第五の極性溶剤とを用いて順に洗浄する工程、この際、前記第五の極性溶剤は前記第四の極性溶剤よりも極性が低く、その結果、前記第四の極性溶剤の洗浄から得られた溶出液はアクテオシドおよびイソアクテオシドを含まず、前記第五の極性溶剤の洗浄から得られた溶出液はアクテオシドおよびイソアクテオシドのみを含み、この際、前記第四の極性溶剤および前記第五の極性溶剤は、水とメタノールとの混合溶剤、または水とエタノールとの混合溶剤である；

を含む製造方法により前記製剤を得る工程を含む、請求項 11 に記載の医薬組成物の製造方法。

【請求項 13】

前記第四の極性溶剤は 25 ~ 35 % のエタノール水溶液であり、前記第五の極性溶剤は 35 ~ 45 % のエタノール水溶液である、請求項 12 に記載の医薬組成物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

本発明はアミロイド ペプチド関連の疾患または症状の予防または治療に用いられる医薬組成物に関し、当該医薬組成物はアミロイド ペプチドの形成、蓄積、または集合を抑制できる有効成分として、アクテオシドおよびイソアクテオシドを含む。

【背景技術】

【0002】

米国特許第7,087,252 B2号明細書は、カンカニクジュヨウ (Cistanche Tubulosa (Schenk) Wight) から抽出されたフェニルエタノイド配糖体を含む医薬製剤であって、25~50重量%のエキナコシドと5~15重量%のアクテオシドとを含む医薬製剤を開示し、当該医薬製剤が老年性認知症の治療に有用である、としている。イソアクテオシドおよび他のフェニルエタノイド配糖体が知られており、これらも前記医薬製剤に含まれている。

10

【0003】

本願出願人は国際公開第2011/157059 A1号においてイソアクテシオドまたはその薬学的に許容される塩をアミロイド ペプチド (A) の形成、蓄積、または集合の抑制に用いることおよびアミロイド ペプチド関連の疾患または症状の予防または治療用の薬剤の製造に用いることを開示する。

【0004】

米国特許第7,087,252 B2号明細書および国際公開第2011/157059 A1号の完全な開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0005】

本出願において発明者は国際公開第2011/157059号の研究を継続し、関連発明を完成させた。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

アミロイド ペプチドおよびその集合体は生命体においてさまざまな疾患または症状を引き起こす可能性があるため、本発明の一目的は、アミロイド ペプチドの形成、蓄積、または集合を抑制するための医薬組成物を提供することであり、このような医薬組成物は食物、飲料、咀嚼物質、パッチ、スキンケア製品等における添加物として使用することができる。本発明の他の目的はアミロイド ペプチド関連の疾患または症状の予防または治療のための医薬組成物を提供することである。

30

【0007】

本発明のさらに他の目的はアミロイド ペプチド関連の疾患または症状の予防または治療のための薬剤の製造における医薬組成物の使用を提供する。

【0008】

本発明に従って提供されるアミロイド ペプチド関連の疾患または症状の予防又は治療のための医薬組成物はアクテオシドおよびイソアクテオシドを有効成分として含有し、当該医薬組成物においてイソアクテオシドのアクテオシドに対する重量比は4:1~1:4である。

【0009】

好ましくは、前記医薬組成物中のイソアクテオシドのアクテオシドに対する重量比は4:1~2:3である。

40

【0010】

好ましくは、前記医薬組成物はエキナコシドを含まない。

【0011】

好ましくは、前記医薬組成物はアミロイド ペプチドの形成、蓄積または集合を抑制することができる。

【0012】

好ましくは、前記医薬組成物は前記アミロイド ペプチドの細胞外の形成、蓄積、または集合を抑制することができる。

50

【 0 0 1 3 】

好ましくは、前記医薬組成物は、前記アミロイド ペプチドに起因する神経損傷またはアポトーシスを抑制することができ、これにより学習および記憶能力を維持、改善または回復する。

【 0 0 1 4 】

好ましくは、前記アミロイド ペプチド関連の疾患または症状は、アルツハイマー病、軽度認知障害、レビー小体認知症、ダウン症候群、遺伝性アミロイド性脳出血（HCHWA）オランダ型、グアムのパーキンソニズム認知症複合、脳アミロイド血管症、封入体筋炎、前頭側頭認知症、加齢性黄斑変性症、またはピック病である。

【 0 0 1 5 】

好ましくは、前記医薬組成物はアルツハイマー病の治療のためのものである。

【 0 0 1 6 】

好ましくは、前記医薬組成物は生命体のアルツハイマー病罹患の予防または遅延のためのものである。

【 0 0 1 7 】

好ましくは、ヒトへの前記医薬組成物の有効投与量が、1日に体重1kgあたり、前記有効成分の0.2mg~4.0mgに相当する。

【 0 0 1 8 】

好ましくは、前記医薬組成物は前記有効成分の源として植物から抽出したフェニルエタノイド配糖体の製剤を含み、前記製剤は前記イソアクテオシドおよび前記アクテオシドを主要なフェニルエタノイド配糖体として含み、前記イソアクテオシドの含有量が前記アクテオシドの含有量より大きい。

【 0 0 1 9 】

好ましくは、前記製剤は、製剤重量を基準として、12~32%のアクテオシドと26~46%のイソアクテオシドとを含む。

【 0 0 2 0 】

好ましくは、前記植物はカンカニクジュヨウである。

【 0 0 2 1 】

好ましくは、前記製剤は以下の工程を含む製造方法により得られる：

a) カンカニクジュヨウの多肉質茎を第一の極性溶剤を用いて抽出する工程；

b) 工程a)から得られた抽出物を、濃縮後、疎水性マクロポラスポリマービーズを充填したカラムに導入し、これによりフェニルエタノイド配糖体が前記ポリマービーズに吸着できるようにする工程；

c) 移動層洗浄液として第二の極性溶剤を用いて、前記カラムを洗浄し、前記フェニルエタノイド配糖体の大部分はポリマービーズ上に吸着させたまま遊離の化合物を除去する工程；

d) 第三の極性溶剤を用いて、ポリマービーズから前記フェニルエタノイド配糖体を溶出させ、前記フェニルエタノイド配糖体を含む溶出液を得る工程、この際、前記第一の極性溶剤は、水、メタノール、エタノール、水とメタノールとの混合溶剤、または、水とエタノールとの混合溶剤であり；前記第二の極性溶剤は水であり；および前記第三の極性溶剤は、メタノール、エタノール、水とメタノールとの混合溶剤、または、水とエタノールとの混合溶剤であり、かつ前記第三の極性溶剤は前記第二の極性溶剤よりも極性が低い；

e) 工程b)から得られた前記フェニルエタノイド配糖体を含む溶出液を濃縮し、再び水に溶解し、得られた水溶液をマクロポラス樹脂と接触させて、前記フェニルエタノイド配糖体を前記マクロポラス樹脂に吸着させる工程；および

f) 前記マクロポラス樹脂を第四の極性溶剤と第五の極性溶剤とを用いて順に洗浄する工程、この際、前記第五の極性溶剤は前記第四の極性溶剤よりも極性が低く、その結果、前記第四の極性溶剤の洗浄から得られた溶出液はアクテオシドおよびイソアクテオシドを含まず、前記第四の極性溶剤の洗浄から得られた溶出液はアクテオシドおよびイソアクテオシドのみを含み、この際、前記第四の極性溶剤および前記第五の極性溶剤は、水とメ

10

20

30

40

50

タノールとの混合溶剤、または水とエタノールとの混合溶剤である。

【0022】

好ましくは、前記第四の極性溶剤は25～35%のエタノール水溶液であり、前記第五の極性溶剤は35～45%のエタノール水溶液である。

【0023】

本発明の上記目的および他の目的、特徴、ならびに利点をよりよく理解するため、添付図面を参照して提示した実施例を用いて本発明を以下に詳述する。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】図1は薬剤A（アクテシオド）、薬剤I（イソアクテオシド）、C（対照群、薬剤なし）、およびAのIに対する比率の異なる医薬組成物の、細胞外A 1-40の蓄積に対する効果を示す。

10

【図2】図2は薬剤A（アクテオシド）、薬剤I（イソアクテオシド）、C（対照群、薬剤なし）、およびAのIに対する比率の異なる医薬組成物の、A 1-42のオリゴマー形成に対する効果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0025】

発明を実施するための最良の形態

アミロイド ペプチドに起因する多様な疾患は共通の特徴：アミロイド ペプチド集合体の形成を有している。このアミロイド ペプチド集合体は原線維または溶菌斑のような形状で存在し、生命体の系統、臓器、組織、または体液中に堆積して、多様な疾患または症状を引き起こす。したがって、アミロイド ペプチドの形成、蓄積、または集合の抑制をアミロイド ペプチド関連の疾患または症状の効果的な予防または治療へのアプローチとして用いることができると考えられる。

20

【0026】

本明細書で使用される「予防」との語は、生命体における疾患または症状の発生を回避または遅延させることを意味する。本明細書で使用される「治療」との語は、疾患もしくは症状の進行を減速もしくは停止させること、または、個体を改善された状況もしくは正常な状況へと回復させることを意味する。

【0027】

「アミロイド ペプチド関連の疾患または症状」との語は一般にアミロイド ペプチドの形成、蓄積、または集中に関連して発生する疾患または症状を指し、特にアミロイド ペプチドに起因する疾患または症状を指す。異常な形成、蓄積、または集中が特定の疾患または症状を有する特定割合の個体に見出される場合、当該疾患または症状がアミロイド ペプチドに関連すると判断することができる。また、特定の疾患または症状において影響を受ける病理学的特徴が発生しそうな場所にアミロイド ペプチドが集合する場合、その疾患または症状もアミロイド ペプチドと関連していると判断することができる。

30

【実施例】

【0028】

以下の実施例では、表1で挙げた試験サンプルを用いてA 実験を行い、さらにいずれの試験サンプルも添加していない対照群（Vehicle）と比較した。

40

【0029】

【表 1】

表1:試験サンプル

記号	試験サンプル	濃度	起源
A	アクテオシド	50 μ g/ml	杏輝実験室、純度 97%
I	イソアクテオシド	50 μ g/ml	杏輝実験室、純度 97%
A:I 40:10	アクテオシド+イソアクテオシド	40 μ g/ml+10 μ g/ml	杏輝実験室、純度 97%
A:I 30:20	アクテオシド+イソアクテオシド	30 μ g/ml+20 μ g/ml	杏輝実験室、純度 97%
A:I 20:30	アクテオシド+イソアクテオシド	20 μ g/ml+30 μ g/ml	杏輝実験室、純度 97%
A:I 10:40	アクテオシド+イソアクテオシド	10 μ g/ml+40 μ g/ml	杏輝実験室、純度 97%

10

20

実施例 1 : 神経芽腫細胞の培養

野生型ヒト神経芽腫細胞 (SH-SY5Y) をイーグル最小必須培地 (EMEM) / ハム F12 培地 (1:1 混合物) (10% FBS、10 ユニット/ml のペニシリン、10 μ g/ml のストレプトマイシンを含有) で培養した。野生型マウス神経芽腫 Neuro-2a 細胞を最小必須培地 (MEM) (10% FBS、10 ユニット/ml のペニシリン、10 μ g/ml のストレプトマイシンを含有) で培養した。

【0030】

実施例 2 : 各試験サンプルに対する A₁₋₄₀ の細胞外蓄積測定

実施例 1 における野生型ヒト神経芽腫 SH-SY5Y 細胞の培地を化学的に明確な培地 (EMEM/F12 培地 (Cat. No. 12500-062)、ヘペス (Hepes) 5 mM、グルコース 0.6%、NaHCO₃ 3 mM、グルタミン 2.5 mM、インスリン 25 μ g/ml、トランスフェリン 100 μ g/ml、プロゲステロン 20 nM、ブトレッシン 60 μ M、亜セレン酸ナトリウム 30 nM、ヘパリン 2 μ g/ml) に取り替えた。各ウェルは 300 μ l の培養培地中に 1×10^5 SH-SY5Y 細胞を含有していた。30 分後、各ウェルを表 1 に挙げられた試験サンプルを用いてそれぞれ総濃度 50 μ g/ml で 24 時間処理した。その後、各ウェルの培地中の A₁₋₄₀ のレベルをヒト A₁₋₄₀ 免疫測定キット (カタログ # KHB3482 Invitrogen) によって分析した。

30

【0031】

ヒト神経芽腫 SH-SY5Y 細胞は A₁₋₄₀ の細胞外蓄積を引き起こす。図 1 は、いずれの試験サンプルでも処理されなかった溶媒対照群 (Vehicle) (C) の培地中の A₁₋₄₀ の量を基準とした、試験サンプルで処理された各 SH-SY5Y ウェルの培地中の A₁₋₄₀ の割合を示す。結果を平均 \pm 標準偏差 (SD) 形式で示した。溶媒対照群と試験サンプルで処理した群との有意な差異を ***, P < 0.001 によって示した。

40

【0032】

図 1 を参照すると、試験サンプル A (アクテオシド) は培地中の A₁₋₄₀ のレベルを約 10% 低減し、試験サンプル A:I 40:10 (アクテオシド 40 μ g/ml + イソアクテオシド 10 μ g/ml) は培地中の A₁₋₄₀ のレベルを約 22% 低減し、残りの試験サンプルは培地中の A₁₋₄₀ のレベルを約 80% 低減する。図 1 の結果は、

50

アクテオシド + イソアクテオシド = 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$; および 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のイソアクテオシド (D) 試験サンプル、ならびにイソアクテオシド 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の試験サンプルが細胞外 A₁₋₄₀ 蓄積の低減に有意な活性を有することを示す。

【0033】

実施例 3 : 各試験サンプルに対する A₁₋₄₂ オリゴマー化の実験

乾燥ヒト A₁₋₄₂ を冷蔵庫から取り出し、室温と平衡な状態とした。A₁₋₄₂ を 1, 1, 1, 3, 3, 3 - ヘキサフルオロ - 2 - プロパノール (HFIP) に 1 mM の濃度で溶解した後、室温で 1 時間放置した。A₁₋₄₂ / HFIP 溶液をハミルトンシリンジで等分した後に、窒素ガス流のもとで乾燥し、-20 の温度で保持した。HFIP で処理した A₁₋₄₂ を PBS 中に溶解し、各試験サンプルを 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度かつ 4 で 24 時間処理しながら振盪培養し、A₁₋₄₂ オリゴマーを調製した。A₁₋₄₂ オリゴマー形成のレベルをチオフラビン T 蛍光発光 (Ex = 450 nm、Em = 482 nm) によって分析した。

【0034】

図 2 は、表 1 の試験サンプルのそれぞれが A₁₋₄₀ オリゴマー化 (oligomerization) に対する影響を示し、その結果を、いずれの試験サンプルでも処理されなかった対照群 (C) に基づく割合で示す。図 2 の結果から、全ての試験サンプルが A₁₋₄₂ オリゴマー化の抑制活性を有することがわかった。ここで、アクテオシド + イソアクテオシド = 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$; および 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ イソアクテオシド (D) 試験サンプル、ならびに、イソアクテオシド = 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の試験サンプルは A₁₋₄₂ オリゴマー化の抑制において好適な活性を有し、原線維または老人斑を形成する A₁₋₄₂ を抑制することができる。

【0035】

以上の結果から、アクテオシドおよびイソアクテオシドの医薬組成物は、A₁₋₄₂ の形成、累積、または集合の有効成分とすることができ、当該医薬組成物は、A₁₋₄₂ に起因する神経損傷またはアポトーシスを抑制し、これにより学習および記憶能力を維持、改善または回復することが予測できる。また、以上の結果から、当該医薬組成物は、A₁₋₄₂ 関連の疾患または症状の予防または治療に用いることができる。

【0036】

記載されている A₁₋₄₂ 関連の疾患または症状は、アルツハイマー病、軽度認知障害、レビー小体認知症、ダウン症候群、遺伝性アミロイド性脳出血 (HCHWA) オランダ型、グアムのパーキンソンズム認知症複合、脳アミロイド血管症、封入体筋炎、前頭側頭認知症、加齢性黄斑変性症、ピック病、およびその他を含むが、これに限定されない。また、記載されている A₁₋₄₂ はせいぜい A₁₋₄₀ または高度に原線維発生的な A₁₋₄₂ で例示したが、A₁₋₄₂ は他のペプチドフラグメントも含むことができる。

【0037】

図 1 および図 2 の結果はイソアクテオシドが良好な活性を有することを示すが、サッカリド含有分子であるイソアクテオシドの応用を実現するには化学的な合成が困難である。植物源から高純度のイソアクテオシドを得るには非常にコストもかかる。経済的利益や薬物治療の有効性などの実用面を考慮すると、図 1 および図 2 の結果はアミロイド ペプチド抑制剤として純粋なイソアクテオシドに相当する活性を有するアクテオシドおよびイソアクテオシドの混合物がアミロイド ペプチド関連の疾患または症状の予防または治療において、精製アクテオシドの代替物として使用することができることを示す。

【0038】

以下の実施例では、米国特許第 7,087,252 号に開示されるフェニルエタノイド配糖体含有製剤を製造する方法を採用し、当該方法は以下の工程 : a) カンカニクジュウの地下部分 (多肉質茎) を抽出する工程と ; b) 工程 a) から得られた抽出物を、疎水性マクロポラスポリマービーズを充填したカラムに導入し、これによりフェニルエタノイ

10

20

30

40

50

ド配糖体が前記ポリマービーズに吸着できるようにする工程と；c) 移動層洗浄液として第二の極性溶剤を用いて前記カラムを溶出して、前記フェニルエタノイド配糖体の大部分を実質的にポリマービーズ上に吸着させたまま遊離の化合物を前記カラムから除去させる工程と；d) フェニルエタノイド配糖体を含む溶出液を得るために第三の極性溶剤を用いて前記カラムを溶出する工程（この際、前記第三の極性溶剤は前記第二の極性溶剤よりも極性が低い）と；を含む。

【0039】

工程a)における第一の極性溶剤は例えば、水、または、水とエタノールとの混合溶剤でありうる。工程c)における第二の極性溶剤は水である。工程d)における第三の極性溶剤は例えば、メタノール、エタノール、水とメタノールとの混合溶剤、または、水とエタノールとの混合溶剤でありうるが、ここでは第三の極性溶剤は水とエタノールとの混合溶剤である。

10

【0040】

本発明は、さらにカンカニクジュヨウ (*Cistanche Tubulosa* (Schenk) Wight) 由来の前記フェニルエタノイド配糖体の製剤を直接精製することによってそこに含まれる最適なフェニルエタノイド配糖体であるアクテオシドおよびイソアクテオシドを含む医薬組成物を得るための精製方法を提供する。さらなる精製方法は、e) 多様なフェニルエタノイド配糖体を含むカンカニクジュヨウ (*Cistanche Tubulosa* (Schenk) Wight) 由来の前記製剤をマクロポラス樹脂を用いて精製する工程と；f) 前記マクロポラス樹脂を第四の極性溶剤と第五の極性溶剤を用いて順に溶出し、その結果、前記第五の極性溶剤溶出から得られた溶出液は実質的にフェニルエタノイド配糖体のアクテオシドおよびイソアクテオシドのみを含む工程と；を含む。本発明の好ましい実施形態の一つにおいて、第四の極性溶剤は例えば25～35%のエタノール水溶液であり、第五の極性溶剤は例えば35～45%のエタノール水溶液でありうる。

20

【0041】

好ましくは、当該疎水性マクロポラスポリマービーズは、架橋された多環芳香族類であり、より好ましくは架橋ポリスチレンまたはスチレンおよびジビニルベンゼンの架橋共重合体（例えば、D-101タイプまたはAB-8タイプの材料）である。

【0042】

フェニルエタノイド配糖体のアクテオシドおよびイソアクテオシドのみを実質的に含有する医薬組成物は、第五の極性溶剤溶出から得られる溶出液を濃縮または乾燥することにより直接的に得ることができる。

30

【0043】

実施例4：フェニルエタノイド配糖体のアクテオシドおよびイソアクテオシドのみを含む医薬組成物

カンカニクジュヨウ (*Cistanche Tubulosa* (Schenk) Wight) の多肉質茎のフレーク10kgをフレークの8倍量の水に浸漬した。フレークを1時間水に浸漬した後、水で2時間煮出した。煮出された混合物をろ過して第一のろ液を得た。その後、残渣を当該残渣の6倍量の水で煮出して、煮出された混合物をろ過して第二のろ液を得た。第三のろ液も第二のろ液と同じ手順で得た。第三のろ液を回収し、真空濃縮し、比重は1.10(50)であった。濃縮形態のろ液をエタノールと混合し、60%のエタノールを含む混合物を形成した後、12時間冷蔵した。その後、冷却された混合物から上澄みを採取する一方、残留物をろ過してろ液を得、これを上澄みと混合して真空濃縮し、比重が1.10(50)である目的抽出物を得た。

40

【0044】

6kgの目的抽出物を加熱しながら、目的抽出物と同量の水に加熱溶解し、その後、徐々に処理済みのマクロポラス樹脂カラムに導入した。最初に水で洗浄し、薬剤の4倍量の水溶出液を収集準備し；40%エタノールで再び洗浄し、薬剤の5倍量の40%エタノール溶出液を収集準備した。水溶出液を再びマクロポラス付着カラム中に注入し、まず

50

、薬剤の3倍量の水で洗浄し、水溶出液を廃棄し；次に40%エタノールで洗浄し、薬剤の4倍量の0%エタノール溶出液を収集準備した。二回の40%エタノール溶出液を混合し、濃縮し、乾燥して、フェニルエタノイド配糖体の製剤1107gを得た。

【0045】

高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した、溶剤A：0.1%ギ酸を含むアセトニトリル(CAN)、溶剤B：0.1%ギ酸を含むMQ-H₂O、カラム：Agilent Zorbax SB-C18カラム、2.1×150mm、5μm；流速：0.3ml/分；UV波長：333nm。上述のフェニルエタノイド配糖体を含む製剤のエキナコシド、アクテオシド、およびイソアクテオシドの含有量を測定し、それぞれ33.6重量%、3.65重量%、および6.05重量%であると算出された。

10

【0046】

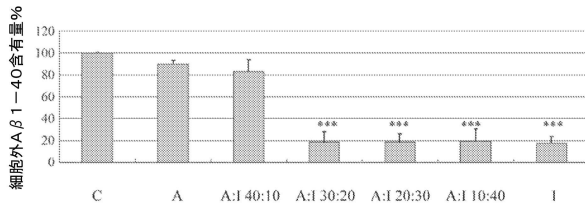
フェニルエタノイド配糖体を含む製剤200gを水800gに溶解し、得られた溶液をマクロポラス樹脂に導入して精製し、これを30%のエタノール水溶液と40%のエタノール水溶液とを用いて順に溶出した。薄層クロマトグラフィー(ポリアミド)をUV365nmで実施し、各溶出液を分析した。ここで、30%エタノール水溶液から収集した溶出液はアクテオシドおよびイソアクテオシドを含有せず、40%エタノール水溶液から収集された溶出液は23.6gのフェニルエタノイド配糖体のアクテオシドおよびアクテオシドのみを含有する。この実施例では、溶出液中のアクテオシドは22.5重量%であり、溶出液中のイソアクテオシドは36.4重量%である。

【0047】

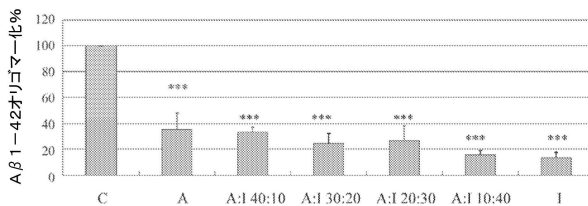
20

上記のいくつかの好ましい実施形態によって本発明を開示したが、これらは本発明を限定するためのものではない。本発明の精神から逸脱することなく当業者により実施される多様な等価な置換や変更もさらに添付の特許請求の範囲の範囲内にある。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 43/00 1 2 1

審査官 砂原 一公

(56)参考文献 米国特許出願公開第2007/0004011(US,A1)
特開2009-196905(JP,A)
WANG, Hongquan et al., Acteoside protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against
-amyloid-induced cell injury, Brain Research, 2009年, Vol.1283, p.139-147
LU Chun-Hua et al., Water-soluble Constituents from Callicarpa pedunculata, Chinese Jo
urnal of Natural Medicines, 2008年 5月, Vol.6, No.3, p.176-178

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)